

25. 2. 2004

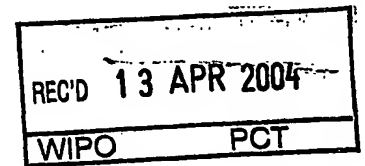
日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 2 月 2 6 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 0 4 8 6 5 8  
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 4 8 6 5 8]



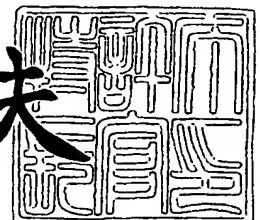
出 願 人  
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構  
国立がんセンター総長

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 3 月 2 5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 PS03-1259  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地 5-1-1 国立がんセンター研究所  
放射線研究部内

【氏名】 江成 政人

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地 5-1-1 国立がんセンター研究所  
放射線研究部内

【氏名】 田矢 洋一

【特許出願人】

【持分】 050/100

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【持分】 050/100

【識別番号】 590001452

【氏名又は名称】 国立がんセンター総長

【代理人】

【識別番号】 100087631

【弁理士】

【氏名又は名称】 滝田 清暉

【選任した代理人】

【識別番号】 100110249

【弁理士】

【氏名又は名称】 下田 昭

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011017

【納付金額】 10,500円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【その他】 国以外の全ての者の持分の割合 5 0 / 1 0 0

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 p 5 3 又はその 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された変異 p 5 3、及びクラスリン重鎖から成る、癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子。

【請求項 2】 前記変異 p 5 3 が、少なくとも 4 6 位の S e r が置換された p 5 3 である請求項 1 又に記載の転写因子。

【請求項 3】 前記変異 p 5 3 が、その 4 6 位の S e r が P h e に置換されている請求項 2 に記載の転写因子。

【請求項 4】 請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の転写因子を有効成分とする癌の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

この発明は、癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

癌抑制遺伝子 p 5 3 は p 2 1、p 5 3 R 2 又は p 5 3 A I P 1 等の標的遺伝子の DNA 配列に特異的に結合して、その転写活性を制御する転写因子であり、近年 p 5 3 の関与する細胞癌化のメカニズムは詳しく研究されてきている（非特許文献 1）。p 5 3 が制御する標的遺伝子の中で、p 5 3 A I P 1 はミトコンドリアに局在するタンパク質で、ミトコンドリアの膜電位とシトクロム c の放出を制御することで正のアポトーシス作用を有している（非特許文献 2，3）。この p 5 3 A I P 1 は p 5 3 によるアポトーシス誘導に重要な役割を持つ S e r 4 6 のリン酸化（特願 2 0 0 1 - 2 9 2 9 5 3）に強い相関を示し、p 5 3 A I P 1 遺伝子の発現により癌細胞のアポトーシスが誘導される。例えば、DNA が損傷される等の強いストレスを受けると、転写因子 p 5 3 の S e r 4 6 が p 5 3 D I N P 1 等の働きによりリン酸化を受け、p 5 3 A I P 1 の発現が誘発され、癌細胞

のアポトーシスが誘導されると考えられている（非特許文献1）。

#### 【0003】

一方、癌細胞のアポトーシスを誘導することを目的として、シスプラチンなどの抗癌剤が使用されているが、ほとんどがDNAに傷をつけることによってアポトーシスを誘導するものである。そのため、正常細胞のDNAにも傷がついて副作用が現れる。癌の放射線療法も同様に正常細胞のDNAに傷がついて副作用が現れる。

この他にも、p53の遺伝子や、p53によって誘導されてアポトーシスを誘導するBaxやp53AIP1などの遺伝子をアデノウィルスベクターに組み込んで癌細胞に感染させ、アポトーシスを誘導させて死滅させようという試みもなされてはいるが、よい結果が得られているとはいえない。

#### 【0004】

##### 【非特許文献1】

細胞工学 vol. 22, No.1, 23-28 (2003)

##### 【非特許文献2】

Oda K. et al., Cell, Vol.102, 849-862, 2000

##### 【非特許文献3】

Matsuda K. et al., Cancer Res., Vol. 62, 2883-2889, 2002

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

この発明は、癌細胞にのみアポトーシスを誘導して死滅させる新しい癌治療の手段を提供することを目的とする。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、癌細胞からp53の発現に伴ってクラスリン重鎖と見られる約170kDaのタンパク質が共沈殿してくることを見出し、クラスリン重鎖のcDNAを発現ベクターに導入して癌細胞の核内へトランスフェクトすると、p53AIP1プロモーターの転写能を高めることを見出した。このような結果から、このクラスリン重鎖とp53と

が結合して転写因子を構成し、p53AIP1プロモーターの転写能を高め、癌細胞のアポトーシスを誘導すると結論された。

#### 【0007】

即ち、本発明は、p53（配列番号1）又はその1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された変異p53、及びクラスリン重鎖（配列番号2）から成る、癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子である。これらは、ヒト等の組織や細胞から抽出・精製して取り出して用いてもよいし、これらをコードするDNAを含む形質転換体を培養して得て用いてもよい。

また、前記変異p53は、少なくとも46位のSerが置換されたp53であってもよく、特にその46位のSerがPheに置換されていることが好ましい。

また本発明は、この転写因子を有効成分とする癌の治療薬である。

#### 【0008】

##### 【発明の実施の形態】

クラスリンには重鎖と軽鎖とがあり、普通は細胞表面から内部への物質の取り込みであるエンドサイトーシスに働く。しかし、本研究の結果、発明者らは、このクラスリン重鎖が、図1に示すように、癌細胞の中で軽鎖とは結合せずにp53と結合してp53の転写活性化能を高め、アポトーシスを強く誘導することを見出した。特に、p53のセリン46をフェニルアラニンに置換したp53とは特に強く結合してアポトーシスも強く誘導する。

本発明の転写因子を何らかの方法で癌細胞に注入するか、又はクラスリン重鎖のみを何らかの方法で癌細胞に注入し癌細胞中に存在するp53と結合させることにより、癌細胞にアポトーシスを誘導して死滅させることができる。

このような転写因子を利用すれば、正常細胞には傷をつけないで、癌細胞にのみ特異的に、従来の方法よりも効果的にアポトーシスを誘導させて死滅させることが可能になり、従来の方法よりも効率のよい癌治療法になる。

#### 【0009】

##### 【実施例】

以下、実施例にて本発明を例証するが、本発明を限定することを意図するもの

ではない。

#### 試験例 1

この試験例では、以後の試験で用いる下記 5 種のベクター（これらを総称して「pcDNA-p53-f」という。）を作成した。

(i) 野生型ヒト p 5 3 遺伝子を p c D N A 3 プラスミド（Invitrogen社、図 2 参照）に挿入した野生型ヒト p 5 3 発現ベクター（以下「WT-p53」という。）

(ii) 4 6 位の S e r を A l a に置き換えた変異型ヒト p 5 3 遺伝子を p c D N A 3 プラスミドに挿入した変異ヒト p 5 3 発現ベクター（以下「S46A-p53」という。）

(iii) 4 6 位の S e r を A s p に置き換えた変異型ヒト p 5 3 遺伝子を p c D N A 3 プラスミドに挿入した変異ヒト p 5 3 発現ベクター（以下「S46D-p53」という。）

(iv) 4 6 位の S e r を P h e に置き換えた変異型ヒト p 5 3 遺伝子を p c D N A 3 プラスミドに挿入した変異ヒト p 5 3 発現ベクター（以下「S46F-p53」という。）

(v) 44～63 位を欠失させた変異型ヒト p 5 3 遺伝子を p c D N A 3 プラスミドに挿入した変異ヒト p 5 3 発現ベクター（以下「44-63-p53」という。）

以上のベクターを以下の手順で作成した。

各種pcDNA-p53-fは、まずpcDNA3プラスミド（Invitrogen社）を制限酵素XhoI部位及びXbaI部位で切断し、9アミノ酸残基からなるFlag配列（GDYKDDDDK）をコードする二本鎖DNA（配列番号 8）を挿入した（pcDNA-f）。作製したpcDNA3-fプラスミドの制限酵素BamHI部位及びXhoI部位を切断し、BamHI部位及びXhoI部位切断末端を持つ野生型ヒトp53遺伝子（配列番号 9）又は変異型ヒトp53遺伝子を挿入した（pcDNA-p53-f）。これらベクターの地図を図 2 に示す。

【0010】

#### 試験例 2

この試験例では、p53AIP1遺伝子イントロン1内にあるp53結合配列を含む約500 bpをpGL3-promoterベクター（Promega社）のluciferase遺伝子上流へ挿入したレポータープラスミドを作成した。

pGL3-promoterベクター (Promega社) を制限酵素SacI部位及びBglIII部位で切断し、制限酵素SacI部位及びBglIII部位切断末端を持つp53結合配列を含むp53AIP1イントロン1 (約500bp、配列番号10) を挿入した。このベクターの地図を図3に示す。以下このレポーターを「p53AIP1pro. reporter」という。

【0011】

### 試験例3

試験例1と同様の操作で、クラスリン重鎖遺伝子 (かずさDNA研究所から分与、配列番号11) をpcDNA3プラスミド (Invitrogen社、図2参照) に挿入して、クラスリン重鎖発現ベクター (以下「pc-CHC」という。) を作成した。このベクターの地図を図4に示す。

【0012】

### 試験例4

この試験例では、試験例1で用意した5種の発現ベクターをヒト骨肉腫由来細胞にトランスフェクトし、その細胞抽出物を調べた。

試験は以下の手順で行った。

- 1)  $7 \times 10^4$ 個のSaos-2細胞 (骨肉腫由来) を24穴プレートに蒔き、一晚培養した。
- 2) トランスフェクションするためのDNAを、試験例1と試験例2で用意したpcDNA-p53-fとp53AIP1pro. reporterを用いて、表1のように調製した。加えた各pcDNA-p53-fは0～30 ng用い、pcDNA3.1と併せて総量30 ngとした。なお、phRG-TKは、ウミシイタケ luciferaseを発現するプラスミド (Promega社、内部コントロール) を示す。トランスフェクションの方法はInvitrogen社のキットに添付されているプロトコールに従った。

【表1】

pcDNA3.1あるいはpcDNA-p53-f	30 ng
p53AIP1pro. reporter	100 ng
phRG-TK	10 ng
Total	140 ng
OPTI-MEM	25 $\mu$ l

DNA溶液

OPTI-MEM	25 $\mu$ l
Lipofectamine 2000	0.28 $\mu$ l

Lipo溶液



## 【0013】

- 3) DNA溶液とLipo溶液を混和し、室温で30分間インキュベーションした。
- 4) そのDNA-liposome複合体を1) で調製した細胞に滴下した。
- 5) 4時間後、DNA-liposome複合体を除去し、細胞を1 X PBS-で洗浄した。
- 6) トランスフェクションしてから24時間後、細胞を1 X PBS-で洗浄し、Dual luciferase assay kit (Promega社) を用いて、細胞中のホタルluciferase活性及びウミシイタケluciferase活性 (内部コントロール) をそれぞれルミノメーターで測定した。その測定方法は、Promega社のキットに添付されているプロトコールに従って行った。
- 7) pcDNA3.1を導入した細胞抽出液中のホタルluciferase活性をウミシイタケluciferase活性で割った値を1とした時の相対的な活性 (Fold Activation) を算出した。

その結果を図5に示す。p53のSer46Phe置換体はp53A1P1プロモーターからの転写を野生型よりもかなり強く誘導することがわかった。

## 【0014】

実施例1

この実施例では、試験例1で用意した5種の発現ベクターをヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトし、その細胞抽出物を調べた。

試験は以下の手順で行った。

- 1)  $9 \times 10^6$  のH1299細胞 (非小肺がん由来) を15 cm ディッシュに蒔き、一晚培養した (10枚) 。
- 2) トランスフェクションするためのDNAを表2のように調製した。トランスフェクションの方法はRoche Applied Scienceのキットに添付されているプロトコールに従った。

【表2】

pcDNA3.1あるいはpcDNA-p53-f	8 $\mu$ g	ディッシュ1枚当たり
FuGENE 6	48 $\mu$ l	
D-MEM	752 $\mu$ l	
DNA-liposome溶液		

## 【0015】

3) そのDNA-liposomeを室温で30分間インキュベーションし、1) で調製した細胞に滴下した。

4) トランスフェクションしてから21時間後、細胞をスクレイパーで剥がし、600 x g、5分間低速遠心して細胞を回収した。

5) 細胞を1度 X PBS-で洗浄した後、10 mlの表3の下記細胞溶解緩衝液で細胞を溶解した。

【表3】

細胞溶解緩衝液\*

50 mM Tris-HCl (pH7.2)	10 µg/ml antipain
150 mM NaCl	10 µg/ml pepstatin
2 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µg/ml chymostatin
0.1 mM EDTA	10 µg/ml leupeptin
0.1 mM EGTA	10 µg/ml E64
0.5 mM DTT	10 µg/ml PMSF
1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0.1 % NP-40
10 mM NaF	

【0016】

6) 細胞を超音波破碎後、不溶性画分を15krpm、15分間、4℃で除去した。

7) その上清を0.2 mlの抗FLAG抗体アガロースビーズ (Sigma) と一晚インキュベーションした。

8) インキュベーション後、ビーズを上記細胞溶解緩衝液で4回洗浄した。

9) その後、1.5 mg/ml FLAGペプチドを含む上記細胞溶解緩衝液で競合的にビーズからp53タンパク質溶出した。

10) その溶出画分をSDS-PAGE次いで銀染色した。

その結果を図6に示す。その結果、S46F置換体ではp53と一緒に分子量170 kDaのタンパク質が強く共沈殿してくる。これをマスマスペクトロメトリーにかけてみたところ、LHIIIEVGTPPTGNQPFPPK、IVLDNSVFSEHR、VANVELYYR、QLPLVKPYLR、及びVDKLDA SESLR (配列番号3~7) のアミノ酸配列が得られた。これらは、それぞれクラスリン重鎖 (配列番号2) の228-245、1011-1022、1398-1406、1444-1453、及び1610-1620位に相当する。これは、この170 kDaのタンパク質がクラスリンの重鎖であることを示す。

## 【0017】

11) 170 kDのタンパク質の同定には銀染色で使われた量の約20倍のタンパク質を濃縮し、SDS-PAGE次いでCBB染色、目的バンドの切り出し、トリプシン消化後、質量分析を用いて行った。

12) 10)の実験手順で得られた溶出液の100分の1容をSDS-PAGE次いでPVDF膜に転写後、抗クラスリン重鎖抗体 (Transduction Laboratories) あるいは抗p53抗体 (Santa Cruz) を用いたウエスタンブロッティング法を行った。ここではAmersham社のhorseradish peroxidase-抗マウスIgG二次抗体とECLキットを用いてバンドを視覚化した。

その結果を図7に示す。S46F置換体にクラスリン重鎖が特に強く結合することがわかった。

## 【0018】

試験例 5

この試験例では、実施例1で用いたヒト非小肺がん由来細胞の核抽出物を調べた。試験は以下の手順で行った。

1) 15 cmディッシュ一枚分を実施例1と同様の手順でトランスフェクションした。

2) 細胞を回収後、1 mlの表4の低張緩衝液\*1で細胞を懸濁し、ホモジナイザーで細胞膜を破壊した。

【表 4】

## 低張緩衝液\*1

10 mM HEPES-KOH (pH7.9)	10 µg/ml antipain
10 mM KCl	10 µg/ml pepstatin
1.5 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µg/ml chymostatin
0.5 mM DTT	10 µg/ml leupeptin
1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	10 µg/ml E64
50 mM NaF	10 µg/ml PMSF

## 高張緩衝液\*2

25 mM HEPES-KOH (pH7.9)	10 µg/ml antipain
420 mM KCl	10 µg/ml pepstatin
10 % glycerol	10 µg/ml chymostatin
0.1 mM DTT	10 µg/ml leupeptin
1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	10 µg/ml E64
50 mM NaF	10 µg/ml PMSF

## 【0019】

- 3) それを600 x g、5分間、4℃で低速遠心し、細胞質画分と核画分に分離した。
- 4) 核画分に関しては2)、3)の操作を2回繰り返し、核画分に細胞質由来のタンパク質の持ち込みをできる限り除去した。
- 5) 核画分を0.2 mlの表4の高張緩衝液\*2で懸濁し30分間氷上に置き、核からタンパク質を溶出した。
- 6) 10 k x g、5分間、4℃で核画分から不溶性画分を除去した。
- 7) 細胞質画分と核画分由来のタンパク質をSDS-PAGE次いでPVDF膜に転写後、抗クラスリン重鎖抗体を用いた実施例1と同様にウエスタンブロッティング法を行った。核画分は細胞質に比べ5倍量の細胞由来のタンパク質を用いた。

その結果を図8に示す。この結果、クラスリンは細胞質でのみ働くと思われていたが、クラスリン重鎖の一部は核内にも存在することを確認した。

## 【0020】

## 実施例2

この実施例では、試験例4の手順のうち2)のトランスフェクションするためのDNAを、試験例3で用意したpc-CHCを用いて、表5のように調製した以外は、試験例4と同様の試験を行った。

【表 5】

pcDNA3.1あるいはpcDNA-p53-f	30 ng
p53AIP1pro.reporter	100 ng
pcDNA3.1あるいはpc-CHC	400 ng
phRG-TK	10 ng
<hr/>	
Total	540 ng
OPTI-MEM	25 $\mu$ l

DNA溶液

OPTI-MEM	25 $\mu$ l
Lipofectamine 2000	0.28 $\mu$ l

Lipo溶液

その結果を図 9 に示す。上記 DNA 溶液において、pc-CHC(400ng)を用いたものをClathrin +、pcDNA3.1(400ng)を用いたものをClathrin -と表記する。

クラスリン重鎖の cDNA を発現ベクターに入れて p53 と共にトランスフェクトすると、p53AIP1 プロモーターからの転写能を高めたことが認められた。特に、S46F 置換体では強く高められた。

【0021】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan Science and Technology Corporation

&lt;120&gt; 癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子

&lt;130&gt; PS03-1259

&lt;160&gt; 11

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln

1

5

10

15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu

20

25

30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp  
 35 40 45  
 Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro  
 50 55 60  
 Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Arg Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser  
 85 90 95  
 Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly  
 100 105 110  
 Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro  
 115 120 125  
 Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln  
 130 135 140  
 Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met  
 145 150 155 160  
 Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys  
 165 170 175  
 Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln  
 180 185 190  
 His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp  
 195 200 205  
 Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu  
 210 215 220  
 Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr  
 245 250 255  
 Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val

260                      265                      270  
 His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn  
 275                      280                      285  
 Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr  
 290                      295                      300  
 Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys  
 305                      310                      315                      320  
 Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu  
 325                      330                      335  
 Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp  
 340                      345                      350  
 Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His  
 355                      360                      365  
 Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met  
 370                      375                      380  
 Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp  
 385                      390  
 <210> 2  
 <211> 1675  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 Met Ala Gln Ile Leu Pro Ile Arg Phe Gln Glu His Leu Gln Leu Gln  
 1                      5                      10                      15  
 Asn Leu Gly Ile Asn Pro Ala Asn Ile Gly Phe Ser Thr Leu Thr Met  
 20                      25                      30  
 Glu Ser Asp Lys Phe Ile Cys Ile Arg Glu Lys Val Gly Glu Gln Ala  
 35                      40                      45  
 Gln Val Val Ile Ile Asp Met Asn Asp Pro Ser Asn Pro Ile Arg Arg

50	55	60
Pro Ile Ser Ala Asp Ser Ala Ile Met Asn Pro Ala Ser Lys Val Ile		
65	70	75
Ala Leu Lys Ala Gly Lys Thr Leu Gln Ile Phe Asn Ile Glu Met Lys		
85	90	95
Ser Lys Met Lys Ala His Thr Met Thr Asp Asp Val Thr Phe Trp Lys		
100	105	110
Trp Ile Ser Leu Asn Thr Val Ala Leu Val Thr Asp Asn Ala Val Tyr		
115	120	125
His Trp Ser Met Glu Gly Glu Ser Gln Pro Val Lys Met Phe Asp Arg		
130	135	140
His Ser Ser Leu Ala Gly Cys Gln Ile Ile Asn Tyr Arg Thr Asp Ala		
145	150	155
Lys Gln Lys Trp Leu Leu Leu Thr Gly Ile Ser Ala Gln Gln Asn Arg		
165	170	175
Val Val Gly Ala Met Gln Leu Tyr Ser Val Asp Arg Lys Val Ser Gln		
180	185	190
Pro Ile Glu Gly His Ala Ala Ser Phe Ala Gln Phe Lys Met Glu Gly		
195	200	205
Asn Ala Glu Glu Ser Thr Leu Phe Cys Phe Ala Val Arg Gly Gln Ala		
210	215	220
Gly Gly Lys Leu His Ile Ile Glu Val Gly Thr Pro Pro Thr Gly Asn		
225	230	235
Gln Pro Phe Pro Lys Lys Ala Val Asp Val Phe Phe Pro Pro Glu Ala		
245	250	255
Gln Asn Asp Phe Pro Val Ala Met Gln Ile Ser Glu Lys His Asp Val		
260	265	270
Val Phe Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Tyr Ile His Leu Tyr Asp Leu Glu		
275	280	285



Thr Gly Thr Cys Ile Tyr Met Asn Arg Ile Ser Gly Glu Thr Ile Phe  
290 295 300

Val Thr Ala Pro His Glu Ala Thr Ala Gly Ile Ile Gly Val Asn Arg  
305 310 315 320

Lys Gly Gln Val Leu Ser Val Cys Val Glu Glu Glu Asn Ile Ile Pro  
325 330 335

Tyr Ile Thr Asn Val Leu Gln Asn Pro Asp Leu Ala Leu Arg Met Ala  
340 345 350

Val Arg Asn Asn Leu Ala Gly Ala Glu Glu Leu Phe Ala Arg Lys Phe  
355 360 365

Asn Ala Leu Phe Ala Gln Gly Asn Tyr Ser Glu Ala Ala Lys Val Ala  
370 375 380

Ala Asn Ala Pro Lys Gly Ile Leu Arg Thr Pro Asp Thr Ile Arg Arg  
385 390 395 400

Phe Gln Ser Val Pro Ala Gln Pro Gly Gln Thr Ser Pro Leu Leu Gln  
405 410 415

Tyr Phe Gly Ile Leu Leu Asp Gln Gly Gln Leu Asn Lys Tyr Glu Ser  
420 425 430

Leu Glu Leu Cys Arg Pro Val Leu Gln Gln Gly Arg Lys Gln Leu Leu  
435 440 445

Glu Lys Trp Leu Lys Glu Asp Lys Leu Glu Cys Ser Glu Glu Leu Gly  
450 455 460

Asp Leu Val Lys Ser Val Asp Pro Thr Leu Ala Leu Ser Val Tyr Leu  
465 470 475 480

Arg Ala Asn Val Pro Asn Lys Val Ile Gln Cys Phe Ala Glu Thr Gly  
485 490 495

Gln Val Gln Lys Ile Val Leu Tyr Ala Lys Lys Val Gly Tyr Thr Pro  
500 505 510

Asp Trp Ile Phe Leu Leu Arg Asn Val Met Arg Ile Ser Pro Asp Gln

515                      520                      525  
Gly Gln Gln Phe Ala Gln Met Leu Val Gln Asp Glu Glu Pro Leu Ala  
530                      535                      540  
Asp Ile Thr Gln Ile Val Asp Val Phe Met Glu Tyr Asn Leu Ile Gln  
545                      550                      555                      560  
Gln Cys Thr Ala Phe Leu Leu Asp Ala Leu Lys Asn Asn Arg Pro Ser  
565                      570                      575  
Glu Gly Pro Leu Gln Thr Arg Leu Leu Glu Met Asn Leu Met His Ala  
580                      585                      590  
Pro Gln Val Ala Asp Ala Ile Leu Gly Asn Gln Met Phe Thr His Tyr  
595                      600                      605  
Asp Arg Ala His Ile Ala Gln Leu Cys Glu Lys Ala Gly Leu Leu Gln  
610                      615                      620  
Arg Ala Leu Glu His Phe Thr Asp Leu Tyr Asp Ile Lys Arg Ala Val  
625                      630                      635                      640  
Val His Thr His Leu Leu Asn Pro Glu Trp Leu Val Asn Tyr Phe Gly  
645                      650                      655  
Ser Leu Ser Val Glu Asp Ser Leu Glu Cys Leu Arg Ala Met Leu Ser  
660                      665                      670  
Ala Asn Ile Arg Gln Asn Leu Gln Ile Cys Val Gln Val Ala Ser Lys  
675                      680                      685  
Tyr His Glu Gln Leu Ser Thr Gln Ser Leu Ile Glu Leu Phe Glu Ser  
690                      695                      700  
Phe Lys Ser Phe Glu Gly Leu Phe Tyr Phe Leu Gly Ser Ile Val Asn  
705                      710                      715                      720  
Phe Ser Gln Asp Pro Asp Val His Phe Lys Tyr Ile Gln Ala Ala Cys  
725                      730                      735  
Lys Thr Gly Gln Ile Lys Glu Val Glu Arg Ile Cys Arg Glu Ser Asn  
740                      745                      750

Cys Tyr Asp Pro Glu Arg Val Lys Asn Phe Leu Lys Glu Ala Lys Leu  
 755 760 765  
 Thr Asp Gln Leu Pro Leu Ile Ile Val Cys Asp Arg Phe Asp Phe Val  
 770 775 780  
 His Asp Leu Val Leu Tyr Leu Tyr Arg Asn Asn Leu Gln Lys Tyr Ile  
 785 790 795 800  
 Glu Ile Tyr Val Gln Lys Val Asn Pro Ser Arg Leu Pro Val Val Ile  
 805 810 815  
 Gly Gly Leu Leu Asp Val Asp Cys Ser Glu Asp Val Ile Lys Asn Leu  
 820 825 830  
 Ile Leu Val Val Arg Gly Gln Phe Ser Thr Asp Glu Leu Val Ala Glu  
 835 840 845  
 Val Glu Lys Arg Asn Arg Leu Lys Leu Leu Leu Pro Trp Leu Glu Ala  
 850 855 860  
 Arg Ile His Glu Gly Cys Glu Glu Pro Ala Thr His Asn Ala Leu Ala  
 865 870 875 880  
 Lys Ile Tyr Ile Asp Ser Asn Asn Asn Pro Glu Arg Phe Leu Arg Glu  
 885 890 895  
 Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Arg Val Val Gly Lys Tyr Cys Glu Lys Arg  
 900 905 910  
 Asp Pro His Leu Ala Cys Val Ala Tyr Glu Arg Gly Gln Cys Asp Leu  
 915 920 925  
 Glu Leu Ile Asn Val Cys Asn Glu Asn Ser Leu Phe Lys Ser Leu Ser  
 930 935 940  
 Arg Tyr Leu Val Arg Arg Lys Asp Pro Glu Leu Trp Gly Ser Val Leu  
 945 950 955 960  
 Leu Glu Ser Asn Pro Tyr Arg Arg Pro Leu Ile Asp Gln Val Val Gln  
 965 970 975  
 Thr Ala Leu Ser Glu Thr Gln Asp Pro Glu Glu Val Ser Val Thr Val

980	985	990
Lys Ala Phe Met Thr Ala Asp Leu	Pro Asn Glu Leu Ile	Glu Leu Leu
995	1000	1005
Glu Lys Ile Val Leu Asp Asn	Ser Val Phe Ser Glu	His Arg Asn
1010	1015	1020
Leu Gln Asn Leu Leu Ile Leu	Thr Ala Ile Lys Ala	Asp Arg Thr
1025	1030	1035
Arg Val Met Glu Tyr Ile Asn	Arg Leu Asp Asn Tyr	Asp Ala Pro
1040	1045	1050
Asp Ile Ala Asn Ile Ala Ile	Ser Asn Glu Leu Phe	Glu Glu Ala
1055	1060	1065
Phe Ala Ile Phe Arg Lys Phe	Asp Val Asn Thr Ser	Ala Val Gln
1070	1075	1080
Val Leu Ile Glu His Ile Gly	Asn Leu Asp Arg Ala	Tyr Glu Phe
1085	1090	1095
Ala Glu Arg Cys Asn Glu Pro	Ala Val Trp Ser Gln	Leu Ala Lys
1100	1105	1110
Ala Gln Leu Gln Lys Gly Met	Val Lys Glu Ala Ile	Asp Ser Tyr
1115	1120	1125
Ile Lys Ala Asp Asp Pro Ser	Ser Tyr Met Glu Val	Val Gln Ala
1130	1135	1140
Ala Asn Thr Ser Gly Asn Trp	Glu Glu Leu Val Lys	Tyr Leu Gln
1145	1150	1155
Met Ala Arg Lys Lys Ala Arg	Glu Ser Tyr Val Glu	Thr Glu Leu
1160	1165	1170
Ile Phe Ala Leu Ala Lys Thr	Asn Arg Leu Ala Glu	Leu Glu Glu
1175	1180	1185
Phe Ile Asn Gly Pro Asn Asn	Ala His Ile Gln Gln	Val Gly Asp
1190	1195	1200

Arg Cys Tyr Asp Glu Lys Met	Tyr Asp Ala Ala Lys	Leu Leu Tyr
1205	1210	1215
Asn Asn Val Ser Asn Phe Gly	Arg Leu Ala Ser Thr	Leu Val His
1220	1225	1230
Leu Gly Glu Tyr Gln Ala Ala	Val Asp Gly Ala Arg	Lys Ala Asn
1235	1240	1245
Ser Thr Arg Thr Trp Lys Glu	Val Cys Phe Ala Cys	Val Asp Gly
1250	1255	1260
Lys Glu Phe Arg Leu Ala Gln	Met Cys Gly Leu His	Ile Val Val
1265	1270	1275
His Ala Asp Glu Leu Glu Glu	Leu Ile Asn Tyr Tyr	Gln Asp Arg
1280	1285	1290
Gly Tyr Phe Glu Glu Leu Ile	Thr Met Leu Glu Ala	Ala Leu Gly
1295	1300	1305
Leu Glu Arg Ala His Met Gly	Met Phe Thr Glu Leu	Ala Ile Leu
1310	1315	1320
Tyr Ser Lys Phe Lys Pro Gln	Lys Met Arg Glu His	Leu Glu Leu
1325	1330	1335
Phe Trp Ser Arg Val Asn Ile	Pro Lys Val Leu Arg	Ala Ala Glu
1340	1345	1350
Gln Ala His Leu Trp Ala Glu	Leu Val Phe Leu Tyr	Asp Lys Tyr
1355	1360	1365
Glu Glu Tyr Asp Asn Ala Ile	Ile Thr Met Met Asn	His Pro Thr
1370	1375	1380
Asp Ala Trp Lys Glu Gly Gln	Phe Lys Asp Ile Ile	Thr Lys Val
1385	1390	1395
Ala Asn Val Glu Leu Tyr Tyr	Arg Ala Ile Gln Phe	Tyr Leu Glu
1400	1405	1410
Phe Lys Pro Leu Leu Leu Asn	Asp Leu Leu Met Val	Leu Ser Pro

1415	1420	1425
Arg Leu Asp His Thr Arg Ala Val Asn Tyr Phe Ser Lys Val Lys		
1430	1435	1440
Gln Leu Pro Leu Val Lys Pro Tyr Leu Arg Ser Val Gln Asn His		
1445	1450	1455
Asn Asn Lys Ser Val Asn Glu Ser Leu Asn Asn Leu Phe Ile Thr		
1460	1465	1470
Glu Glu Asp Tyr Gln Ala Leu Arg Thr Ser Ile Asp Ala Tyr Asp		
1475	1480	1485
Asn Phe Asp Asn Ile Ser Leu Ala Gln Arg Leu Glu Lys His Glu		
1490	1495	1500
Leu Ile Glu Phe Arg Arg Ile Ala Ala Tyr Leu Phe Lys Gly Asn		
1505	1510	1515
Asn Arg Trp Lys Gln Ser Val Glu Leu Cys Lys Lys Asp Ser Leu		
1520	1525	1530
Tyr Lys Asp Ala Met Gln Tyr Ala Ser Glu Ser Lys Asp Thr Glu		
1535	1540	1545
Leu Ala Glu Glu Leu Leu Gln Trp Phe Leu Gln Glu Glu Lys Arg		
1550	1555	1560
Glu Cys Phe Gly Ala Cys Leu Phe Thr Cys Tyr Asp Leu Leu Arg		
1565	1570	1575
Pro Asp Val Val Leu Glu Thr Ala Trp Arg His Asn Ile Met Asp		
1580	1585	1590
Phe Ala Met Pro Tyr Phe Ile Gln Val Met Lys Glu Tyr Leu Thr		
1595	1600	1605
Lys Val Asp Lys Leu Asp Ala Ser Glu Ser Leu Arg Lys Glu Glu		
1610	1615	1620
Glu Gln Ala Thr Glu Thr Gln Pro Ile Val Tyr Gly Gln Pro Gln		
1625	1630	1635

Leu Met Leu Thr Ala Gly Pro Ser Val Ala Val Pro Pro Gln Ala

1640 1645 1650

Pro Phe Gly Tyr Gly Tyr Thr Ala Pro Pro Tyr Gly Gln Pro Gln

1655 1660 1665

Pro Gly Phe Gly Tyr Ser Met

1670 1675

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu His Ile Ile Glu Val Gly Thr Pro Pro Thr Gly Asn Gln Pro Phe

1 5 10 15

Pro Lys

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Val Leu Asp Asn Ser Val Phe Ser Glu His Arg

1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Val Ala Asn Val Glu Leu Tyr Tyr Arg

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Leu Pro Leu Val Lys Pro Tyr Leu Arg

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Val Asp Lys Leu Asp Ala Ser Glu Ser Leu Arg

1 5 10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> flag

<400> 8

Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 9

<211> 1182

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atggaggagc cgagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca 60



gacctatgga aactacttcc tgaaaacaac gttctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg 120  
 gatgatttga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggg tcaactgaaga cccaggtcca 180  
 gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct ccccgctggg cccctgcacc agcagctcct 240  
 acaccggcgg cccctgcacc agccccctcc tggccccctgt catcttctgt cccttcccag 300  
 aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaag 360  
 tctgtgactt gcacgtactc ccctgccctc aacaagatgt ttgccaact ggccaagacc 420  
 tggcctgtgc agctgtgggt tgattccaca ccccgcccg gcacccgct cgcgccatg 480  
 gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgctgccc ccacatgag 540  
 cgctgctcag atagcgatgg tctggcccct cctcagcatc ttatccgagt ggaaggaaat 600  
 ttgcgtgtgg agtatttggg tgacagaaac acttttcgac atagtgtggg ggtgccctat 660  
 gagccgcctg aggttggctc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt 720  
 tcctgcatgg gcggcatgaa ccggaggccc atcctcacca tcatcacact ggaagactcc 780  
 agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgcatg tttgtgcctg tcctgggaga 840  
 gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg agcctcacca cgagctgccc 900  
 ccaggaggca ctaagcgagc actgcccac aacaccagct cctctcccca gccaaagaag 960  
 aaaccactgg atggagaata tttcacctt cagatccgtg ggcgtgagcg cttcgagatg 1020  
 ttccgagagc tgaatgaggc cttggaactc aaggatgccc aggctgggaa ggagccaggg 1080  
 gggagcaggg ctactccag ccacctgaag tccaaaaagg gtcagtctac ctcccgccat 1140  
 aaaaaactca tgttcaagac agaagggcct gactcagact ga 1182

<210> 10

<211> 465

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ccatttcctc agagaacacg gcccccttgg gccaaaagga catgaagaag ctcttgctaa 60  
 tgccagcctg gctctcctca tccgcccc tgcaccctg cccttctggc tgccctccct 120  
 tctctagct ctgtccctc tcaattcagg agtctcaagt ccttcagact actccaaagt 180  
 cgggggatct ctggatgggt aggaggtgat ctaccgcct cctctcttgc ccgggcttgt 240  
 cgagatgaac ttcctgatgc tggcggcgct gaagctgaca ctagcggggg cacctccctg 300

acatgaacgc ccctcgagac tgggccagtg ctctgatgc ctgggcacct gcggaaaggc 360  
 acccagcgtg gccgccgtgg catgccttga gtgtgtgggt ggggactgtt gcaaactgac 420  
 attccagctg tcccagtcca ttttgtgctg ctctcacaca acccc 465

<210> 11

<211> 5028

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atggcccaga ttctgccaat tcgttttcag gagcatctcc agctccagaa cctgggtatc 60  
 aaccagcaa acattggctt cagtaccctg actatggagt ctgacaaatt catctgcatt 120  
 agagaaaaag taggagagca ggcccaggtg gtaatcattg atatgaatga cccaagtaat 180  
 ccaattcgaa gaccaatttc agcagacagc gccatcatga atccagctag caaagtaatt 240  
 gcactgaaag ctgggaaaac tcttcagatt tttacattg aaatgaaaag taaaatgaag 300  
 gctcatacca tgactgatga tgtcaccttt tggaaatgga tctctttgaa tacggttgct 360  
 cttgttacgg ataatgcagt ttatcactgg agtatggaag gagagtctca gccagtgaag 420  
 atgtttgatc gccattctag ccttgcaggg tgccagatta tcaattaccg tacagatgca 480  
 aaacaaaagt gggttacttct gactggtata tctgcacagc aaaatcgtgt ggtgggagct 540  
 atgcagctat attctgtaga taggaaagtg tctcagccca ttgaaggaca tgcagctagc 600  
 tttgcacagt ttaagatgga aggaaatgca gaagaatcaa cgttattttg ttttgcagtt 660  
 cggggccaag ctggaggga gttacatatt attgaagttg gcacaccacc tacagggaac 720  
 cagccctttc caaagaaggc agtggatgtc ttctttcctc cagaagcaca aaatgatttt 780  
 cctgttgcaa tgcagatcag tgaaaagcat gatgtggtgt tcttgataac caagtatggt 840  
 tatatccacc tctatgatct tgagactggt acctgcatct acatgaatag aatcagtgga 900  
 gaaacaattt ttgttactgc acctcatgaa gccacagctg gaataattgg agtaaacaga 960  
 aagggacaag ttctgtcagt gtgtgtggaa gaagaaaaca taattcctta catcaccaat 1020  
 gttctacaaa atcctgattt ggctctgaga atggctgtac gtaataactt agccggtgct 1080  
 gaagaactct ttgcccgga atttaatgct ctttttgccc agggaaatta ctccgaggca 1140  
 gcaaagggtg ctgctaattgc accaaaggga attcttcgta ctccagacac tatccgtcgg 1200  
 ttccagagtg tcccagccca gccagggtcaa acttctcctc tacttcagta ctttggtatc 1260

cttttggacc agggacagct caacaaatac gaatccttag agctttgtag gcctgtactt 1320  
cagcaagggc gaaaacagct tttggagaaa tggttaaaag aagataagct ggaatgttct 1380  
gaagaactgg gtgatcttgt gaaatctgtg gaccctacat tggcacttag tgtgtaccta 1440  
agggctaacg tcccaaataa agtcattcag tgctttgcag aaacagggtca agtccaaaag 1500  
attgttttat atgctaaaaa agttggatac actccagatt ggatatttct gctgagaaat 1560  
gtaatgcgaa tcagtccaga tcaggacag cagtttgccc aaatgttagt tcaagatgaa 1620  
gagcctcttg ctgacatcac acagattgta gatgtcttta tggaatacaa tctaattcag 1680  
cagtgtactg cattcttgct tgatgctctg aagaataatc gcccatctga aggtccttta 1740  
cagacgcggt tacttgagat gaaccttatg catgcgcctc aagttgcaga tgctattcta 1800  
ggcaatcaga tgttcacaca ttatgaccgg gctcatattg ctcaactgtg tgaaaaggct 1860  
ggcctactgc agcgtgcatt agaacatttc actgatttat atgatataaa acgtgcagtg 1920  
gttcacaccc atcttcttaa ccttgagtgg ttagtcaact actttggttc cttatcagta 1980  
gaagactccc tagaatgtct cagagccatg ctgtctgcca acatccgtca gaatctgcag 2040  
atttgtgttc aggtggcttc taaatatcat gaacaactgt caactcagtc tctgattgaa 2100  
ctttttgaat ctttcaagag ttttgaaggt ctcttttatt ttctgggatc cattgttaac 2160  
tttagccagg acccagatgt gcactttaaa tatattcagg cagcttgcaa gactgggcaa 2220  
atcaaagaag tagaaagaat ctgtagagaa agcaactgct acgatcctga gcgagtcaag 2280  
aattttctta aggaagcaaa actaacagat cagctaccac ttatcattgt gtgtgatcga 2340  
tttgactttg tccatgattt ggtgctctat ttatatagaa ataatcttca aaagtatata 2400  
gagatatatg tacagaaggt gaatccaagt cgacttcctg tagttattgg aggattactt 2460  
gatgttgact gttctgaaga tgtcataaaa aacttgattc ttgttgtaag aggtcaattc 2520  
tctactgatg agcttgttgc tgaggttgaa aaaagaaaca gattgaaact gcttctgcct 2580  
tggttagagg ccagaattca tgagggctgt gaggagcctg ctactcacia tgccttagcc 2640  
aaaatctaca tagacagtaa taacaacccg gagagatttc ttcgtgaaaa tccctactat 2700  
gacagtcgcg ttgttggaag gtattgtgag aagagagatc cacatctggc ctgtgttgct 2760  
tatgaacgtg gccaatgtga tctggaactt attaatgttt gcaatgagaa ttcctcttc 2820  
aaaagtcttt ctcgctacct ggtacgtcga aaggatccag aattgtgggg cagcgtgctg 2880  
ctggaaagca atccttacag gagacccta attgaccagg ttgtacaaac agctttgtct 2940  
gagactcagg accctgaaga agtgtcagta actgtaaagg ctttcatgac tgcagacctt 3000

cctaataaac tcattgaact gctggagaaa attgtccttg ataactctgt attcagtga 3060  
cacaggaatc tgcaaaacct ccttatccctc actgcaatta aggctgaccg tacacgtgtt 3120  
atggagtata ttaaccgcct ggataattat gatgccccag atattgccaa tategccatc 3180  
agcaatgagc tgtttgaaga agcatttgcc attttccgga aatttgatgt caatacttca 3240  
gcagttcagg tcttaattga gcatattgga aacttggatc gggcatatga gtttgctgaa 3300  
cgttgcaatg aacctgcggt ctggagtcaa ctigcaaaaag cccagttgca gaaaggaatg 3360  
gtgaaagaag ccattgattc ttatatcaaa gcagatgac cttcctccta catggaagtt 3420  
gttcaggctg ccaatactag tggaaactgg gaagaactgg tgaagtactt gcagatggcc 3480  
cgtaagaagg ctcgagagtc ctatgtggag acagaactga tattcgact ggctaaaaca 3540  
aaccgccttg cagagttaga agaatttatc aatggaccaa ataatgctca tatccaacaa 3600  
gttggtgacc gttgttatga tgaaaaaatg tatgatgctg ctaagttgtt gtacaataat 3660  
gtttccaatt ttggacgttt ggcatctacc ctgggtcacc tgggtgaata tcaggcagct 3720  
gttgatgggg ctaggaaagc taacagtact cgaacatgga aagaggtctg cttgcctgt 3780  
gtagatggga aagaattccg tcttgctcag atgtgtggac ttcattattgt tgtacatgca 3840  
gatgaattag aagaacttat caactactat caggatcgtg gctattttga agagctgac 3900  
accatgttgg aagcagcact gggacttgag cgagctcaca tgggaatgtt tactgaatta 3960  
gctattctat actctaaatt taagcctcag aaaatgaggg agcacctgga gctgttctgg 4020  
tctagagtga atattcccaa ggtgctaaga gctgcagaac aagctcatct ttgggcagaa 4080  
ctgggtgttt tgtatgacaa gtatgaagaa tatgataatg ccataattac catgatgaat 4140  
catccaactg atgcctggaa agaagggcaa ttcaaagata tcattaccaa ggttgccaat 4200  
gtggaactat actacagagc aatacagttc tacttagaat tcaagcctct gttgttaaatt 4260  
gatttgctga tggtgctgtc tccacggttg gatcacactc gtgcagtcaa ttatttcagc 4320  
aaggttaaac agctaccact ggtgaaaccg tatttgctgt cagttcagaa ccataacaac 4380  
aaatctgtga atgaatcatt gaacaatctt tttattacag aagaagatta tcaggctctg 4440  
cgaacatcaa tagatgctta tgacaacttt gacaatatct cgcttgctca gcgtttggaa 4500  
aaacatgaac tcattgagtt caggagaatt gctgcttate tcttcaaagg caacaatcgc 4560  
tggaacaga gtgtagagct gtgcaagaaa gacagccttt acaaggatgc aatgcagtat 4620  
gcttctgaat ctaaagatac tgaattggct gaagaactcc tgcagtgggt tttgcaggaa 4680  
gaaaaagag agtgctttgg agcttgtctg tttacctgtt acgatctttt aaggccagat 4740

gtcgtcctag aaactgcatg gaggcacaat atcatggatt ttgccatgcc ctatttcac 4800  
caggtcatga aggagtactt gacaaagggtg gataaattag atgcttcaga atcactgaga 4860  
aaagaagaag aacaagctac agagacacaa cccattgttt atggtcagcc ccagttgatg 4920  
ctgacagcag gacccagtgt tgccgtccct cccaggcac cttttgggta tggttatacc 4980  
gcaccaccgt atggacagcc acagcctggc tttgggtaca gcatgtga 5028

【図面の簡単な説明】

【図 1】

クラスリン重鎖による p 5 3 A I P 1 の転写活性の制御を示す概念図である。

【図 2】

p c - p 5 3 - f ベクターの構造を示す図である。

【図 3】

p 5 3 A I P 1 . p r o . r e p o r t e r ベクターの構造を示す図である。

【図 4】

p c - C H C ベクターの構造を示す図である。

【図 5】

発現ベクター (pcDNA-p53-f) をヒト骨肉腫由来細胞にトランスフェクトし、その p 5 3 A I P 1 プロモーターからの転写能を示す図である。

【図 6】

発現ベクター (pcDNA3.1、pcDNA-p53-f) をヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトした細胞抽出物の S D S - P A G E (銀染色) を示す図である。

【図 7】

発現ベクター (pcDNA-p53-f) をヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトした細胞抽出物の抗クラスリン重鎖抗体及び抗 p 5 3 抗体によるウエスタンブロットを示す図である。図中、WTはWT-p53、46AはS46A-p53、46DはS46D-p53、46FはS46F-p53、Δ44-63は44-63-p53を用いたものを示す。

【図 8】

発現ベクター (pcDNA3.1、pcDNA-p53-f) をヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトした細胞の細胞質及び核抽出物に対し、抗クラスリン重鎖抗体を用いたウエスタンブロットを示す図である。図中、pcDNAはpcDNA3.1、WTはWT-p53、46F

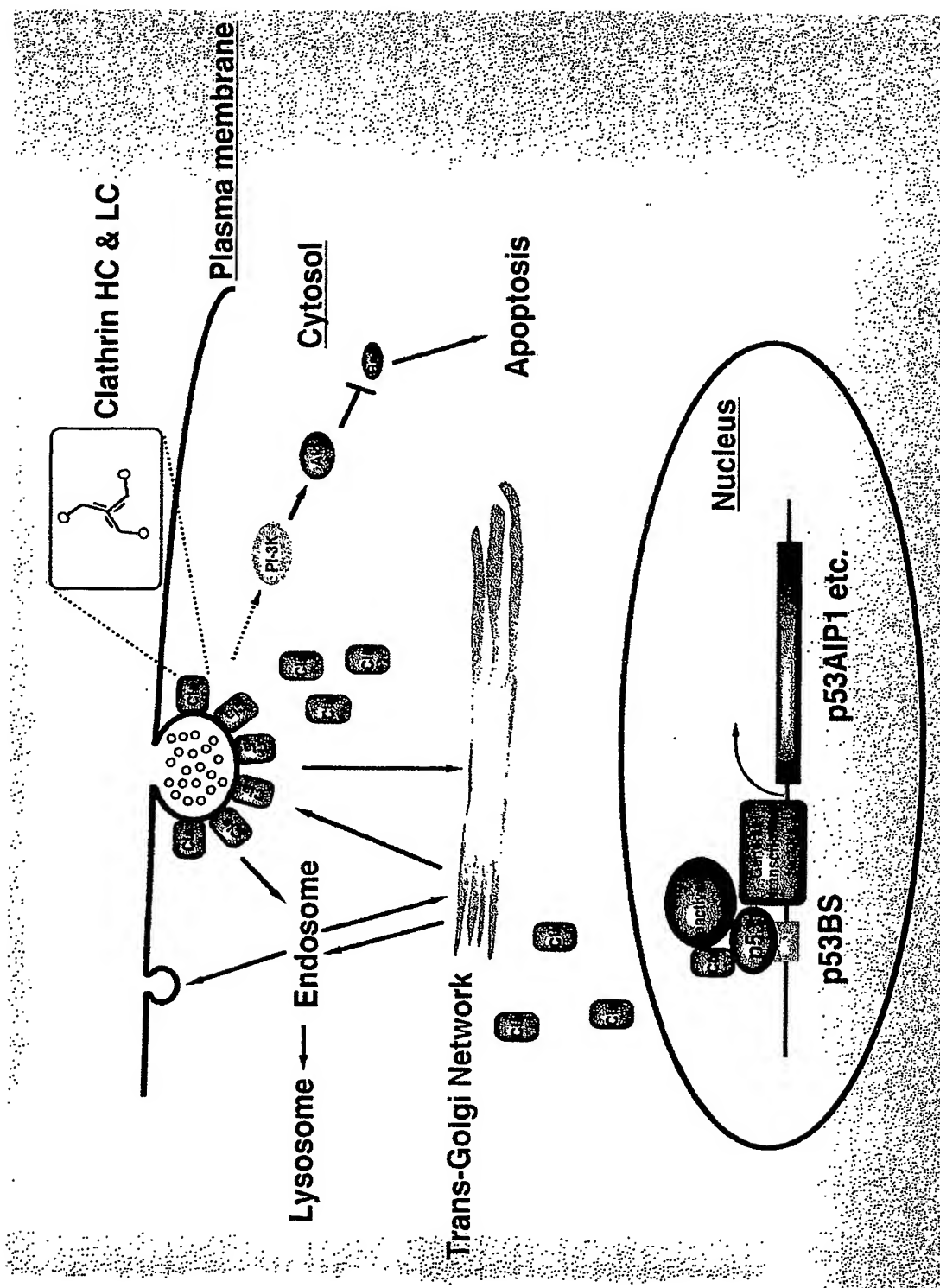
はS46F-p53、 $\Delta$ 44-63は44-63-p53を用いたものを示す。

【図9】

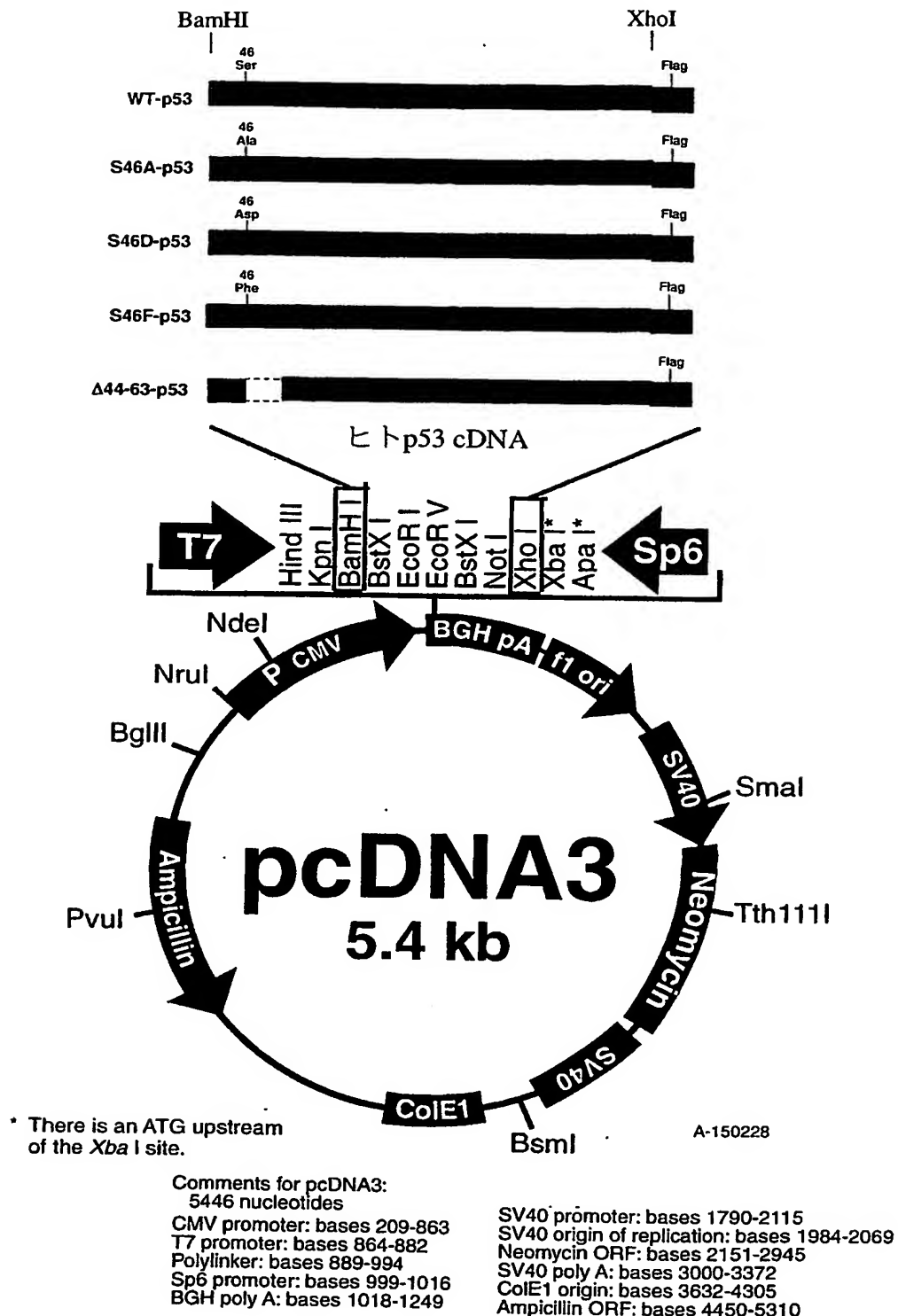
クラスリン重鎖の cDNA を入れた発現ベクター (pc-CHC) と p53 発現ベクター (pcDNA-p53-f) を共にヒト骨肉腫由来細胞にトランスフェクトし、その細胞抽出物を調べた結果を示す図である。図中、Clathrin HCはpc-CHC、WTはWT-p53、S46FはS46F-p53、 $\Delta$ 44-63は44-63-p53を用いたものを示す。

【書類名】 図面

【図 1】

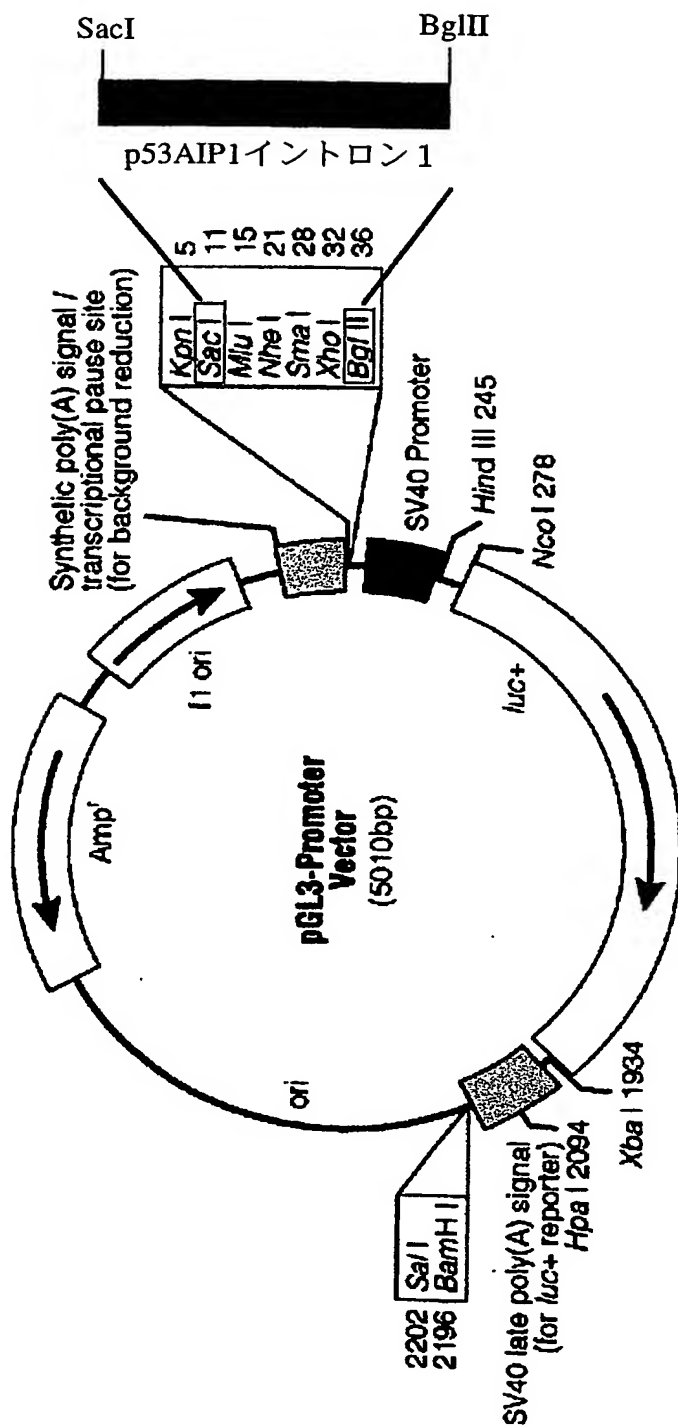


【図 2】

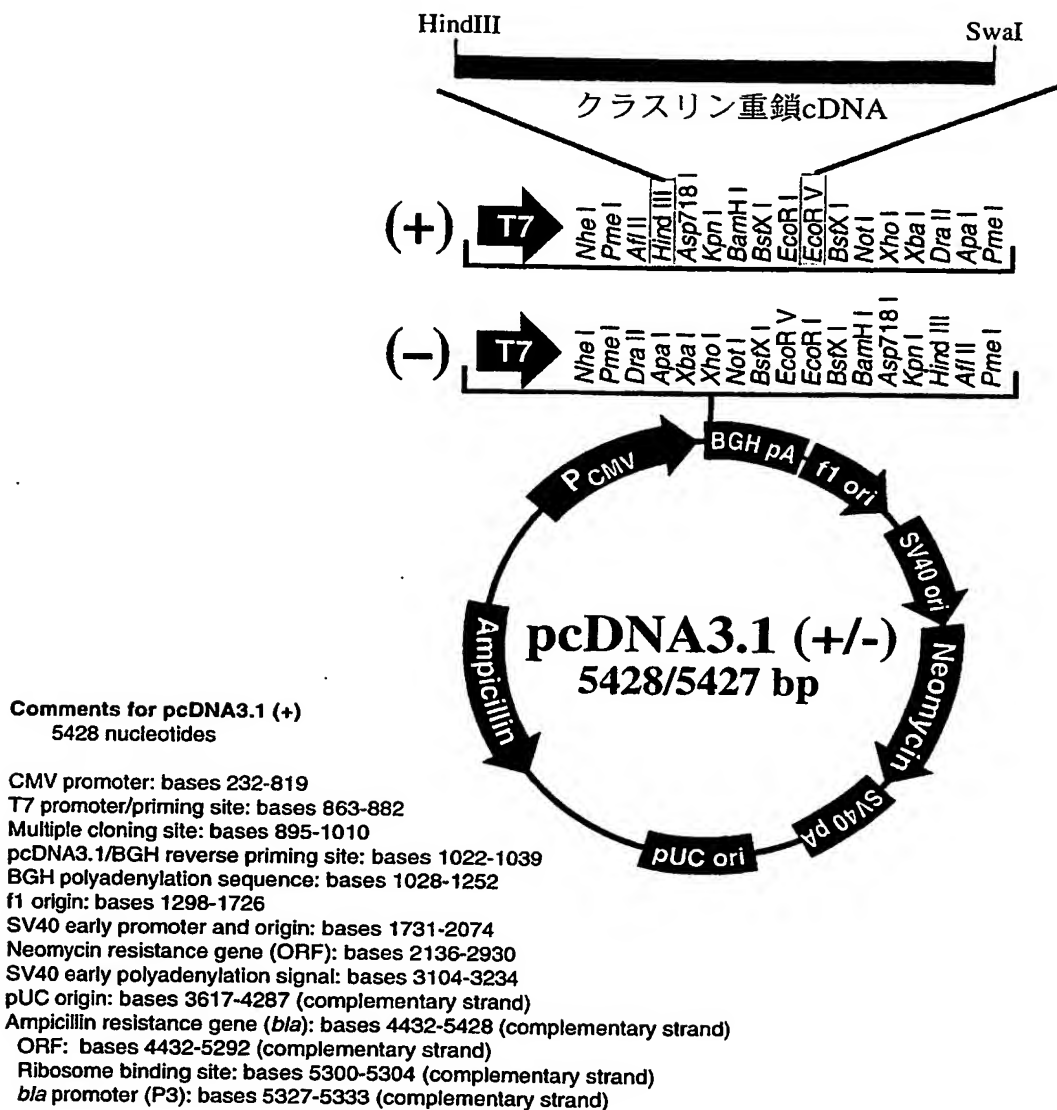




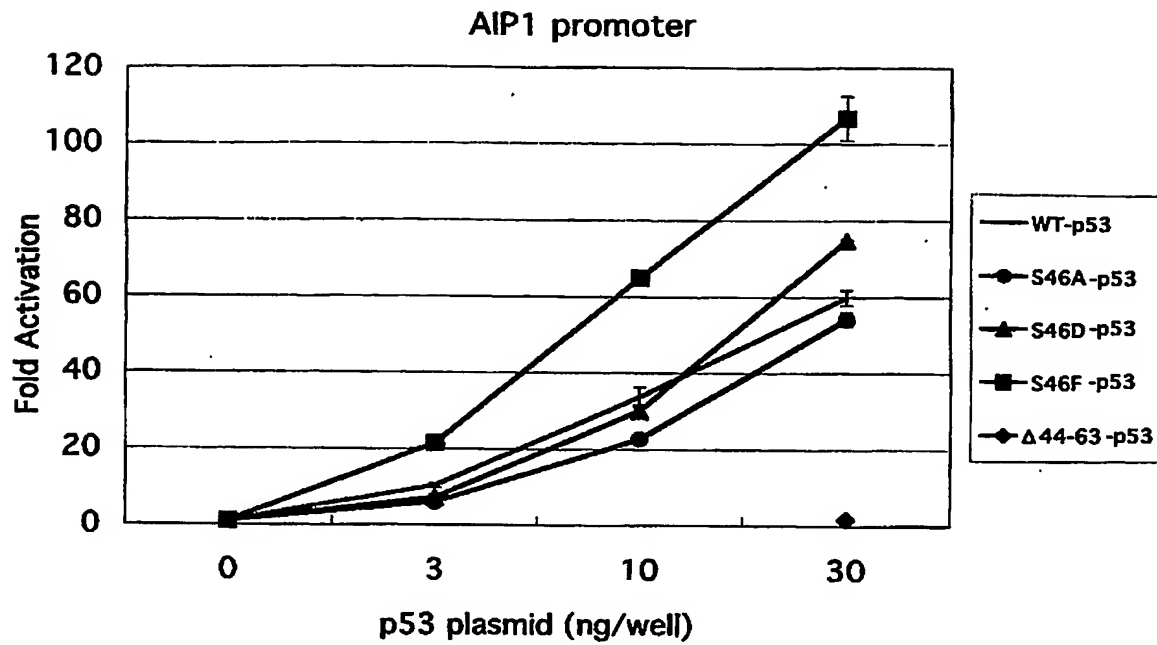
【図 3】



【図4】

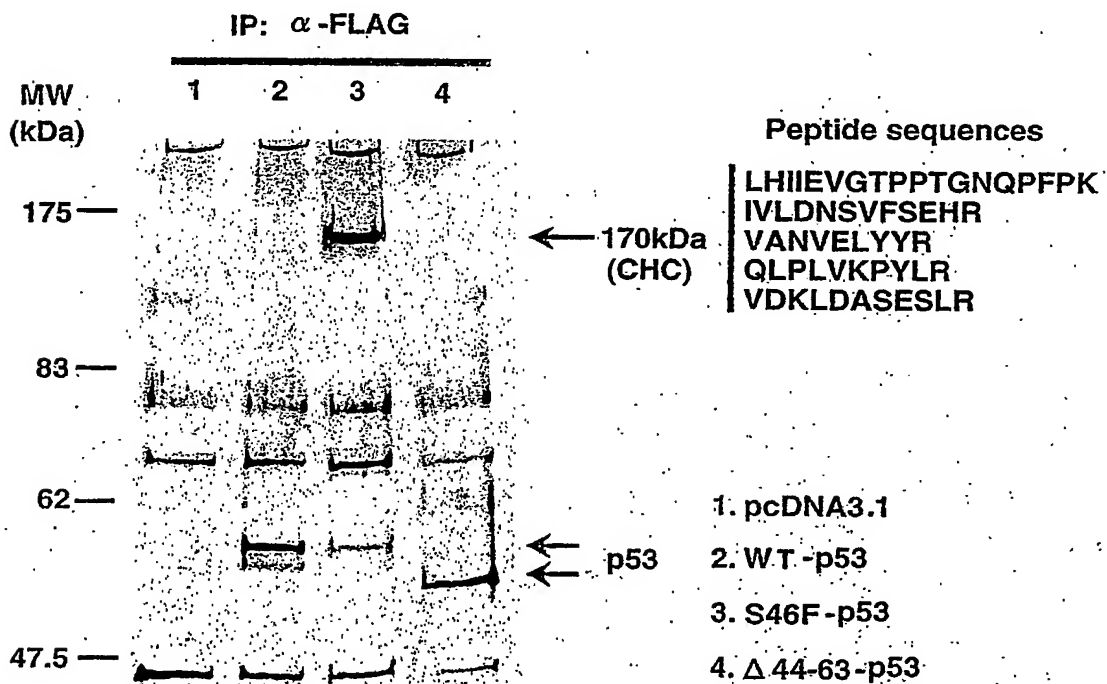


【図 5】

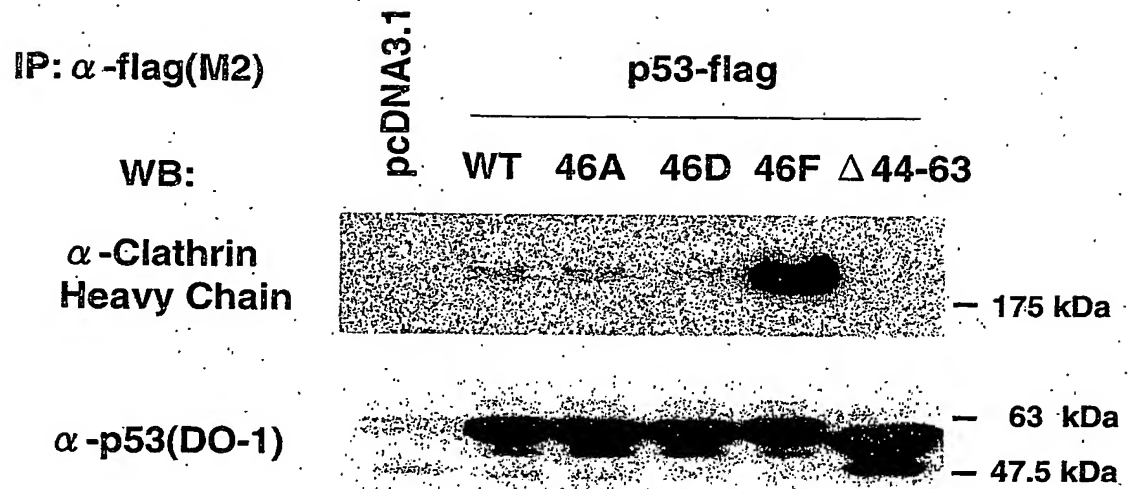


【図 6】

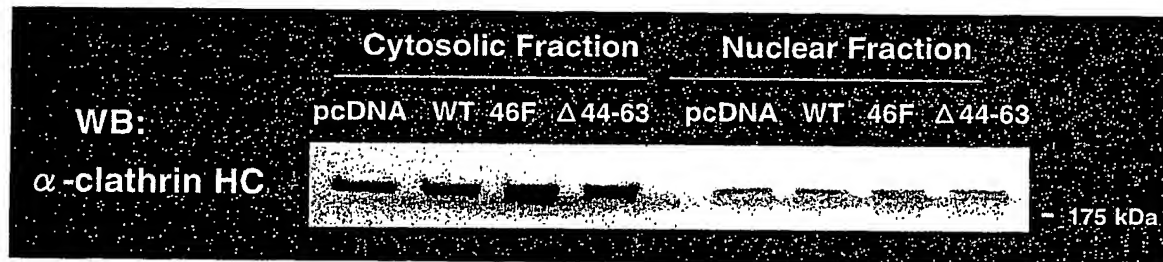
(a) Silver staining



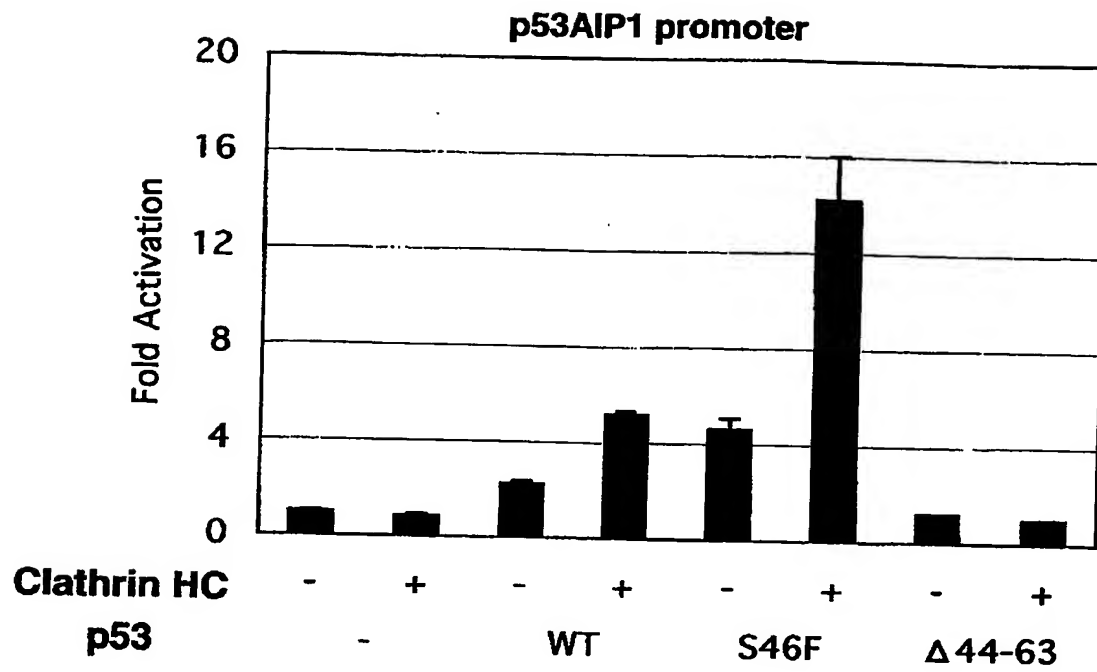
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 癌細胞にのみアポトーシスを誘導して死滅させる新しい癌治療の手段を提供する。

【解決手段】 p 5 3 又は 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された変異 p 5 3、及びクラスリン重鎖から成る、癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子である。この転写因子は、p 5 3 A I P 1 プロモーターの転写能を高め、癌細胞のアポトーシスを誘導する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-048658
受付番号	50300306695
書類名	特許願
担当官	塩野 実 2151
作成日	平成15年 5月20日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 2月26日
-------	-------------

次頁無

**【書類名】** 出願人名義変更届 (一般承継)  
**【提出日】** 平成15年10月31日  
**【あて先】** 特許庁長官 殿  
**【事件の表示】**  
**【出願番号】** 特願2003- 48658  
**【承継人】**  
**【識別番号】** 503360115  
**【住所又は居所】** 埼玉県川口市本町四丁目1番8号  
**【氏名又は名称】** 独立行政法人科学技術振興機構  
**【代表者】** 沖村 憲樹  
**【連絡先】** 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417  
**【提出物件の目録】**  
**【物件名】** 権利の承継を証明する書面 1  
**【援用の表示】** 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。  
**【物件名】** 登記簿謄本 1  
**【援用の表示】** 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。



特願 2003-048658

ページ: 1

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住所  
氏名

1998年 2月24日

名称変更

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

科学技術振興事業団

特願 2003-048658

ページ： 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[590001452]

1. 変更年月日

1990年12月12日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区築地5丁目1番1号

氏 名

国立がんセンター総長

特願 2003-048658

ページ : 3/E

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構